

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Evaluación *in vitro* del efecto de carbohidrasas sobre la bioaccesibilidad de las proteínas en harinas de altramuz (*Lupinus* spp.)

AUTOR:

ARMANDO ARIAS SANVICENTE

DIRECTOR:

MANUEL DÍAZ LÓPEZ

CONVOCATORIA DE DEFENSA: 24 de Julio de 2013

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ALTRAMUZ	3
PROTEÍNAS	3
Globulinas y albuminas	4
FACTORES ANTINUTRICIONALES	4
Inhibidores de las proteasas	4
HIDRATOS DE CARBONO	5
Oligosacáridos solubles: α -galactósidos	6
Polisacáridos no amiláceos (NSP)	7
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	9
MATERIALES	9
HARINAS	9
ENZIMAS	10
DESCRIPCIÓN QUÍMICA DE LA ESPECIFICIDAD DE LAS ENZIMAS UTILIZADAS	10
Xilanasa (endo- β -1,4-xilanasas)	10
Celulasas	11
Glucanasas/ laminarinasa	11
β -Galactosidasa	11
α -amilasa	12
MÉTODOS	12
DESENGRASADO DE LA HARINA	12
CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA	13
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA TRIPSINA	14
DISEÑO EXPERIMENTAL	15
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LAS HARINAS EN FUNCIÓN DEL pH	15
Obtención de la proteína soluble a diferentes pHs	15
Determinación del índice de solubilización de la proteína (PSI, %)	15
VALORACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEASA POR LAS HARINAS	15
Extracción del inhibidor	15

Valoración de la actividad inhibidora	16
TRATAMIENTO DE LAS HARINAS CON CARBOHIDRASAS Y EXTRACCIÓN PROTEICA	16
Tratamiento enzimático	16
Extracción de la proteína soluble a pHs 2.5 y 9.5	16
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
RESULTADOS	17
EFFECTO DEL pH EN LA SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LAS HARINAS DE ALTRAMUZ	17
VALORACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEASA (TRIPSINA) POR LAS HARINAS DE ALTRAMUZ	18
TRATAMIENTO DE LAS HARINAS DE ALTRAMUZ CON CARBOHIDRASAS	20
EFFECTO DE LA ADICIÓN DE CARBOHIDRASAS SOBRE LA SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA	20
EFFECTO DE LA ADICIÓN DE CARBOHIDRASAS SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA TRIPSINA	23
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

RESUMEN

Debido al costo elevado y fluctuaciones en la disponibilidad de la harina de pescado, las proteínas vegetales se han constituido como la alternativa más viable para su sustitución en la elaboración de piensos acuícolas. Las leguminosas están consideradas como la principal proteína vegetal por su elevado contenido de proteína de buena calidad, sin embargo su calidad nutricional es afectada por la presencia de factores antinutricionales, entre los que destacan los inhibidores de proteasas.

La soya es la leguminosa más ampliamente utilizada en la alimentación de peces ya sea entera o como harina desengrasada. Debido a la demanda sobre la soya, se han explorado otras fuentes de proteína para alimentos, entre los que destacan los altramuces.

La semilla de altramuz se ha convertido en una alternativa a la sustitución de la soya, para la alimentación de animales monogástricos (peces, cerdos, aves), debido a su contenido proteico (30-50%) muy similar al de la soya. Los ensayos de solubilización de la proteína han demostrado unos índices altos en las 3 especies estudiadas, tanto a pH ácido (30-40%) como alcalino (65-75%) destacando *Lupinus mutabilis* por su mayor porcentaje de proteína soluble a pH alcalino, si bien presenta un amplio intervalo de insolubilización entre los pHs 3 y 5. De forma paralela también se ha detectado un alto % inhibición de la tripsina en las proteínas solubilizadas en los dos extremos de pH ensayado.

La bioaccesibilidad hacia las proteínas de los altramuces para la hidrólisis de proteasas parece estar limitada, debido a su alto contenido en polisacáridos no amiláceos (NSP) ricos en galactosa, ocasionando un “efecto jaula” sobre las proteínas de esas semillas influenciado por la pared celular.

La aplicación de procesos biotecnológicos con enzimas específicas: xilanasas, glucanasas, galactosidasas y celulasas, a las harinas de altramuz podría disminuir el impacto de los polisacáridos no amiláceos en la limitación de la bioaccesibilidad de la proteína del alimento por parte de las proteasas digestivas en animales monogástricos, mejorando su eficiencia e índices de conversión. Se ha demostrado que hay un efecto positivo significativo de la xilanasas, glucanasas y celulasas para las 3 especies de altramuces, en las proteínas extraídas a pH ácido, que no se demostró en la solubilización de las proteínas a pH alcalino.

Los tratamientos con carbohidrasas no incrementaron en ningún caso la solubilización de los inhibidores de la tripsina. No obstante, estas enzimas podrían reducir parte de los efectos antinutritivos que tiene el altramuz cuando se administra directamente en la alimentación de monogástricos (flatulencias, síndrome de mala absorción, diarreas, etc.) producidas tanto por alcaloides como por polisacáridos no hidrolizables.

El desarrollo de un proceso biotecnológico que aplique la tecnología enzimática puede revalorizar las harinas de altramuz, tanto en aspectos nutricionales como económicos, incrementando su campo de aplicación y mejorando su eficiencia.

INTRODUCCIÓN

En el año 2001, el uso de harinas de origen animal y de subproductos cárnicos (harina de carne y huesos de origen rumiante) como aditivos para la elaboración de piensos en la alimentación de ganado fueron prohibidos por la comisión europea (Directiva CE 999/2001), con el propósito de interrumpir el ciclo de reinfección en el ganado por encefalopatía espongiforme bovina (EEB), y así garantizar la seguridad de los consumidores de productos de origen animal.

Estimaciones de la FAO en 2008, la producción acuícola mundial alcanzó los 68,8 millones de toneladas; de esta cantidad, 52,9 millones de toneladas correspondieron a animales acuáticos y 15,9 millones de toneladas a plantas acuáticas. El volumen de producción de animales acuáticos representó el 46,7 % del suministro mundial de peces comestibles durante el mismo año. Teniendo en cuenta el aumento de la población mundial y la imposibilidad de disponer en el futuro de alimentos acuáticos adicionales procedentes de la pesca de captura marina, se prevé que, por lo menos para mantener el nivel actual de consumo per cápita, para el año 2030 el mundo necesitará un suministro adicional de 23 millones de toneladas de alimentos acuáticos, que deberán provenir de la acuicultura.

Según la FAO, en 2008 alrededor de 31,7 millones de toneladas de peces (el 46,1 % de la producción mundial total de animales acuáticos) dependían del suministro de alimento en forma de pienso acuícola, lo que conlleva a una demanda en la producción de dietas proteicas. La harina de pescado se convirtió en la fuente primaria de proteína para la elaboración de los alimentos balanceados para los animales que se manejan en sistemas controlados (aves, cerdos, peces).

En el caso de la acuicultura, este insumo es esencial en las dietas completas para cultivos, ya que para satisfacer los elevados requerimientos nutricionales de los peces se necesitan altos niveles de proteína de alta calidad, con adecuados balances de aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales y otros nutrientes que la harina de pescado puede proporcionar (FAO, 2008).

Debido a que este insumo normalmente es costoso, lo que afecta notablemente el precio del alimento terminado, por lo que la tendencia actual es reducir al máximo su uso sustituyéndolo con proteínas alternativas disponibles y económicas, obtenidas de diferentes fuentes, principalmente de origen vegetal; sin embargo, todavía no se han desarrollado dietas sin harina de pescado que sustituyan en su totalidad, por lo que se hace necesario seguir investigando a fin de identificar materiales vegetativos de alto valor proteico, como es el caso particular de las legumbres.

La harina de soja se convirtió como alternativa proteica de origen vegetal para las dietas de animales monogástricos (cerdos, peces, aves), porque posee un alto contenido de proteína (45-50%). Por otra parte una de las restricciones de la agricultura orgánica, es la de aceptar el uso de productos de semillas orgánicas procesadas, es decir, cuando se someten a extracciones con disolventes (hexano), o el uso de ingredientes en los piensos genéticamente modificados (soja). Por lo tanto, es de suma importancia desarrollar

alternativas adecuadas para cumplir con los requerimientos proteicos para desarrollo óptimo de los animales monogástricos (Jezierny, 2009).

Otra alternativa como fuente de proteína vegetal, se encuentra en la leguminosa llamada altramuza o lupino (*Lupinus spp.*)(**Figura 1**). El lupino o altramuza es una leguminosa herbácea, anual, leñosa, con flores multicolores y vainas. Crece en suelos pobres de minerales y son plantas que son tolerantes al frío, estas condiciones marginales hacen que se desarrolló en diversos ambientes (Ruiz-López *et al.*, 2000).

Actualmente se conocen más de 1,500 especies de altramuces, cuya morfología y composición química varían según las condiciones del ambiente en que habitan. El género está dividido en dos grandes regiones genéticas: Una corresponde a gran parte de América, con la mayoría de las especies, y la otra a Europa y a la mitad del Norte de África, con una decena de especies silvestres y algunas cultivadas (Gross, 1982).



Figura 1. Vaina del Lupino o altramuza (*Lupinus spp.*)

Composición química del altramuza

Las semillas de los altramuces presentan elevadas concentraciones de proteínas, de las cuales se encuentran en mayoría en forma de globulinas y albuminas, que pueden ser comparadas con otras fuentes proteicas vegetales como el caso de la soja (*Glycine max*),

Proteínas

El contenido proteico general de las leguminosas se encuentra en un rango de 15-45%, siendo más elevado que el de los cereales (7-17%). Las proteínas de la semilla, se

localiza principalmente en los cotiledones y en el endospermo, mientras que una pequeña fracción se localiza en la cascarilla (Marquardt *et al.*, 1975).

En caso particular de las semillas de altramuces presentan alrededor de un 35-50% de proteína, de las cuales están constituidas en su mayoría por globulinas (31-43%), y albuminas (8-16%) (De Haro, 1983).

Globulinas y albuminas

Las globulinas son proteínas de reserva, son solubles en soluciones salinas y se localizan en el cotiledón, constituidas a su vez por dos fracciones: α -conglutina o legumina y β -conglutina o vicilina. Las albuminas son un grupo heterogéneo que presentan de 10 a 20 fracciones con diferentes pesos moleculares, forman complejos con carbohidratos y ácidos nucleicos; y además son más ricas que las globulinas en aminoácidos esenciales especialmente en metionina (Lampart-Szczapa, 2001).

En general las diferentes variedades de las semillas de altramuces poseen un gran potencial como fuente de energía y proteína para el ganado, sin embargo desde el punto de vista de asimilación nutricional para animales monogástricos está muy limitada, ocasionado por factores antinutricionales que poseen las semillas y que hacen difícil poder acceder a la fracción proteica asimilable (proteína soluble susceptible de ser hidrolizada por proteasas digestivas).

Factores antinutricionales

El término factor antinutricional se utiliza para calificar a aquellos compuestos que afectan el valor nutricional de algunos alimentos, especialmente en semillas, porque dificultan o inhiben la asimilación de nutrientes que provienen de alimentos generalmente de origen vegetal (proteínas y minerales). Se han descrito como factores antinutricionales tanto a proteínas inhibidoras de las enzimas digestivas como hidratos de carbono no hidrolizables por las enzimas digestivas de los animales monogástricos, los cuales al no ser hidrolizados producen síndromes de mala digestión, provocando una serie de alteraciones gástricas, como son diarreas, flatulencias, distensión visceral, entre otras.

Los factores antinutricionales podemos clasificarlos como termoestables y termolábiles. Los termoestables presentan enlaces cruzados difíciles de desnaturalizar formando una estructura tridimensional, estos incluyen oligosacáridos, saponinas y fitatos. Y los termolábiles llegan a destruirse o desnaturalizarse en presencia de calor, como son los inhibidores de proteasas (tripsina y quimotripsina), lectinas, y antivitaminas (Krogh *et al.*, 2010).

Inhibidores de las proteasas

Los inhibidores de proteasas son proteínas distribuidas ampliamente entre los vegetales, quienes tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de enzimas digestivas como las serina-proteasas (tripsina y quimotripsina) propias del tracto

gastrointestinal de los animales, aunque también pueden inhibir proteasas endógenas y enzimas de bacterias, hongos e insectos (Domoney, 1999).

El principal modo de acción de los inhibidores de la proteasa, es formar enlaces irreversibles con las enzimas (tripsina pancreática y quimotripsina) formando complejos activos y estables, inactivándolas, y reducir la digestibilidad de los aminoácidos (Liener, 1989).

Están ampliamente distribuidos en las semillas de las plantas, y en la mayoría de las leguminosas. Tradicionalmente, los inhibidores pertenecen a dos clases, el inhibidor de Kunitz que está presente en la soja, y al de la familia de Bowman-Birk inhibidores de tripsina/quimotripsina que se producen en el resto de las leguminosas (Saini, 1993).

Los inhibidores de los altramuces son de naturaleza Bowman-Birk, de los cuales gran parte de este inhibidor puede eliminarse utilizando tratamientos como: procesos térmicos, la germinación y la fermentación; estos tratamientos desnaturalizan las proteínas mejorando su digestibilidad. Sin embargo, un tratamiento por calor excesivo puede dañar las proteínas, disminución de los aminoácidos disponibles y una digestibilidad más baja de la proteína, lo que representa pérdida de calidad (Birk *et al.*, 1990).

Hidratos de carbono

La semillas de altramuz contienen una menor proporción de almidones y monosacáridos y una mayor proporción de oligosacáridos de bajo peso molecular y especialmente de polisacáridos no amiláceos (NSPs) cuando se comparan con otras leguminosas de contenido proteico similar, como la soja (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006) (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido y composición de los hidratos de carbono en harinas de semillas de altramuces en comparación con la harina de soja (*Glycine max*) (g/kg MS)

Especie	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. mutabilis</i>	<i>Glycine max</i>
Almidón	74	68	-	51-69
Sacarosa	24	35	-	57-70
Rafinosa	10	11	19	8-10
Estaquiosa	53	43	23	47-49
Verbascosa	14	20	10	0-3
Fibra	130	163	-	67
NDF	-	220-261	-	-
ADF	-	154-230	-	-
ADL	-	6-9	-	-
Hemicelulosa	-	40-66	-	40-71
Celulosa	-	133-199	-	71
Total NSP	405	-	-	217
(-) ningún valor reportado, NDF (Fibra neutro detergente), ADF (Fibra ácido detergente), ADL (Lignina ácido detergente); Hemicelulosa= NDF-ADF; Celulosa= ADF-ADL; NSP= polisacáridos no amiláceos.				

Oligosacáridos solubles: α -galactósidos

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (OFR): rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajucosa, son α -galactósidos que se encuentran dentro del grupo de los oligosacáridos de galactosil sacarosa. Son compuestos de reserva presentes en cantidades variables en órganos vegetativos y en semillas de numerosas plantas, incluidas las leguminosas, como es el caso del altramuз.

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa se caracterizan por tener uno o más grupos α -D-galactopiranosil, unidos por enlace α -(1 \rightarrow 6)-galactosídico al C6 de la molécula de glucosa que forma parte de la sacarosa (α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranósido). Estos azúcares se acumulan en diferentes proporciones en las semillas de altramuз, predominando estaquiosa o verbascosa (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008)(**Figura 2**). Estos azúcares no-reductores de bajo peso molecular son solubles en agua y en soluciones de agua-alcohol, o bien hidrolizados enzimáticamente con α -galactosidasa hasta azúcares bioaccesibles por las carbohidrasas de los monogástricos.

Los α -galactósidos están presentes en cantidades variables y son compuestos de reserva en órganos vegetativos y en semillas de numerosas plantas. Estos compuestos no son digeribles por animales monogástricos debido a la ausencia de la enzima α -(1-6)-galactosidasa en la mucosa intestinal; como consecuencia estos oligosacáridos de la rafinosa pasan al colon y son fermentados por las bacterias intestinales produciendo una considerable cantidad de gases (CO_2 , H_2 y CH_4), principalmente dióxido de carbono(CO_2). Esta producción de gases es la responsable de la flatulencia que se manifiesta en forma de náuseas, contracciones musculares, diarreas, etc. (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008).

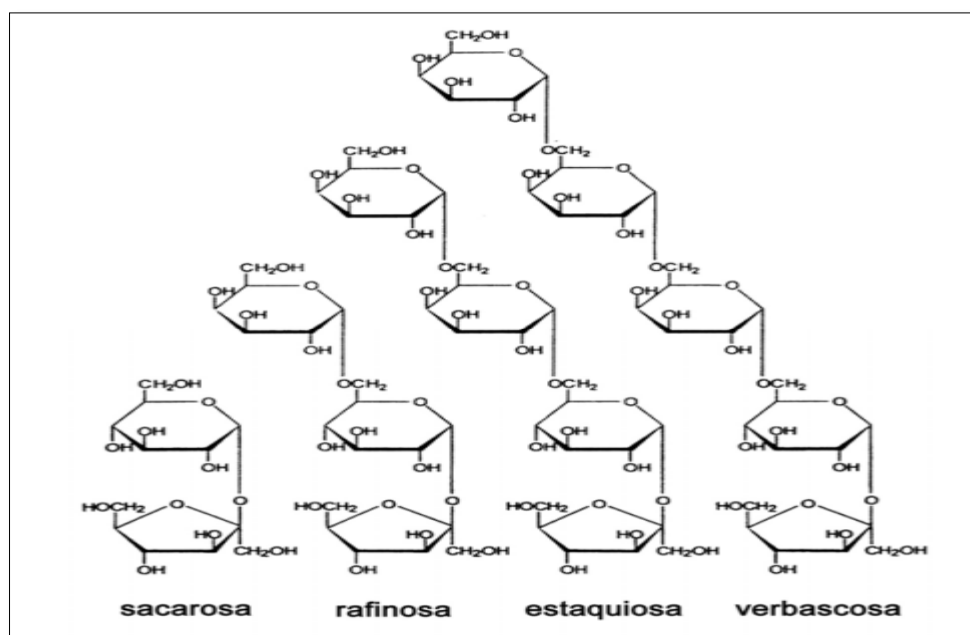


Figura 2. Estructura química de la sacarosa y de los α -galactósidos.

Polisacáridos no amiláceos (NSP)

Los polisacáridos no amiláceos (NSP) juntos con la lignina fueron definidos como la fibra dietética, representando mayoritariamente los polisacáridos estructurales de la pared celular. Incluyen una amplia variedad de moléculas, de las cuales pueden estructurarse en tres grupos: la celulosa, hemicelulosa, y los polisacáridos pécticos. Mientras los dos primeros fundamentalmente se encuentran en la cascarilla, las pectinas mayoritariamente están presentes en los cotiledones.

Los NSP, no pueden ser digeridos porque son resistentes a las enzimas digestivas de los animales monogástricos, de manera que, en el colon son fermentados por la flora bacteriana, liberándose ácidos grasos de cadena corta (Reddy, *et al.*, 1984).

La química de los carbohidratos de altramuz es diferente a la mayoría de las leguminosas, con niveles insignificantes de almidón y altos niveles (hasta 500g/Kg semillas) de NSP solubles e insolubles y oligosacaridos (α -galactósidos), (**Tabla 2**) (van Barneveld, 1999).

Tabla 2. Comparación de la composición de carbohidratos (g/kg MF) de fuentes de proteínas vegetales comúnmente utilizados en dietas animales

Proteína vegetal				
Harinas	Soja	Guisante	Habas	Altramuces
α -galactósidos en MS	60	50	54	77
Almidón	27	454	407	14
Celulosa	62	53	81	131
Hemicelulosa	-	10-15	40-46	93-99
Total de NSP	217	180	190	405
NSP solubles en MS	63	52	50	134
NSP insolubles en MS	92	76	59	139
Análisis de lignina	16	12	20	12
Fibra dietética	233	192	210	416
CHO y lignina	400	735	705	534
(-) ningún valor reportado, NSP= polisacáridos no amiláceos, CHO= hidratos de carbono. MS= masa seca. MF= masa fresca				

Los principales hidratos de carbono de almacenamiento en las semillas de altramuz son NSP caracterizados por la presencia mayoritaria del polisacárido β -(1-4)-galactano, compuesto por una mezcla de D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa y ácido galacturónico, que comprenden la mayor parte del material del núcleo de la pared celular, la celulosa y la hemicelulosa de las cubiertas de las semillas y endospermo (Petterson, 2000).

La degradación de β -(1-4)-galactanos en la naturaleza se llevan a cabo por enzimas microbianas endo- β -(1-4) galactanasas (EC 3.2.1.89), que cortan el polímero de alto peso molecular dentro de la cadena, dando como resultado oligómeros cortos, y las β -

galactosidasas (EC 3.2.1.23) que hidrolizan estos galactosacaridos cortos en galactosa (Tabachnikov y Shoham, 2013).

Algunos autores, los polisacáridos solubles de la cascarilla estarían compuestos de cadenas de β - galactomananos y cadenas cortas de arabinoxilanos (Chesson, 1987).

Todos estos NSP pueden interferir negativamente en la bioaccesibilidad de las proteínas de la semilla debido a un “**efecto jaula**” producido por la interacción de sus estructuras moleculares de la **pared celular** (compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y proteínas glicosiladas) (**Figura 3**), ejerciendo un efecto de encapsulación de nutrientes (Choct, 2001). Este efecto también puede ser ejercido también sobre los factores antinutricionales proteicos (inhibidores de proteasas) tan comunes en semillas de leguminosas.

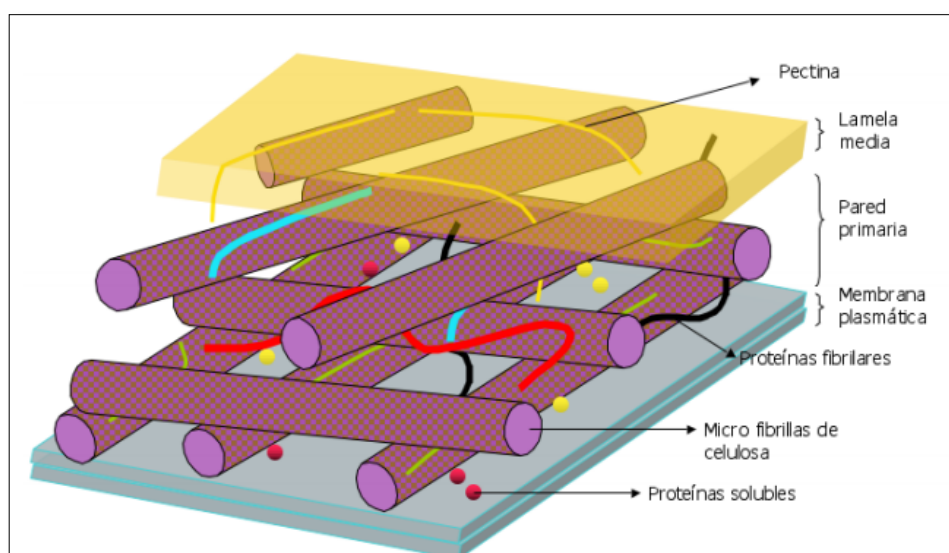


Figura 3. Pared celular y sus partes fundamentales

HIPÓTESIS

La química y concentración de los NSP del altramuze puede ejercer un “efecto jaula” sobre los cuerpos proteicos de las semillas, donde se almacenan las proteínas de reserva en forma de globulinas y albuminas. La utilización de enzimas específicas que hidrolicen esos NSP, podrían favorecer la bioaccesibilidad de estas proteínas a la acción de las proteasas digestivas.

OBJETIVOS

1) Caracterizar y cuantificar la solubilización de proteínas de la harina de altramuze por acción de tratamientos ácidos y alcalinos.

2) Caracterización y cuantificación de los cambios inducidos por el pretratamiento con carbohidrasas sobre la extracción de la proteína soluble e inhibidores de proteasas de las harinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

Harinas

Par el estudio se utilizaron tres especies de altramuces (*L. albus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis*) descascaradas y tamizadas con tamaño de partícula < a 250 micras, proporcionadas por la Universidad Católica de Temuco en Chile, por el Dr. Adrián Hernández. Las harinas presentan una composición proximal conocida con especial atención al contenido y composición de la fracción glucídica (NSP solubles, insolubles, oligosacáridos) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Composición proximal de los altramuces sin/con cascara

Especie	sin cascara			con cascara		
	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. mutabilis</i>	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. mutabilis</i>
Variedad	Rumbo 2011	Lila 2011	E 66	Rumbo 2011	Lila 2011	E 66
Materia seca (%)	91.35	90.31	92.88	91.77	92.17	88.08
Proteína (%)	48.77	41.74	48.17	39.98	33.24	45.54
Extracto Etéreo (%)	10.45	8.31	19.09	8.21	6.33	16.74
Fibra (%)	3.14	3.62	5.18	14.24	18.62	8.95
Cenizas Totales (%)	3.88	3.02	4.54	3.56	2.84	4.37
Extracto no nitrogenado %	33.76	43.31	23.02	34.02	38.97	24.41

Enzimas

Para el tratamiento de enzimático de las harinas se utilizaron distintas clases de carbohidrasas comerciales de las empresas **NOVOZYME** y **SIGMA ALDRICH** (Tabla 4).

Tabla 4. Carbohidrasas comerciales utilizadas para el tratamiento de las harinas

Empresa	Nombre comercial	Clase de enzima	Código enzima	Origen	ABREV. Enzima	pH en soluc.	Temp. Optima
NOVOZYME	Shearzyme [®] 500 L	Xilanasa(endo- β -1,4-xilanasas)	EC 3.2.1.8	<i>Aspergillus oryzae</i>	Xila1	4.9	40 °C
SIGMA	Sigma X2753	endo- β -1,4-xilanasas	EC 253-439-7	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Xila2	5	40°C
NOVOZYME	Viscozyme [®] L	Endo-1,3(4)- β -glucanasa : Xilanasa, Celulasa, Hemicelul	EC 3.2.1.6	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Gluca	5	40°C
NOVOZYME	Lactozym pure [®] 6500 L	β -Galactosidasa	EC 3.2.1.23	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Galac	6.9	40°C
NOVOZYME	Celluclast [®] 1.5 L	Celulasa	EC 3.2.1.4	<i>Trichoderma reesei</i>	Celul	5.2	37°C
NOVOZYME	Ban 480 L	α –amilasa	EC 3.2.1.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Amila	6	40°C

Descripción química de la especificidad de las enzimas utilizadas

Xilanasa (endo- β -1,4-xilanasas)

Estas enzimas actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos β (1 \rightarrow 4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños (**Figura 4**).

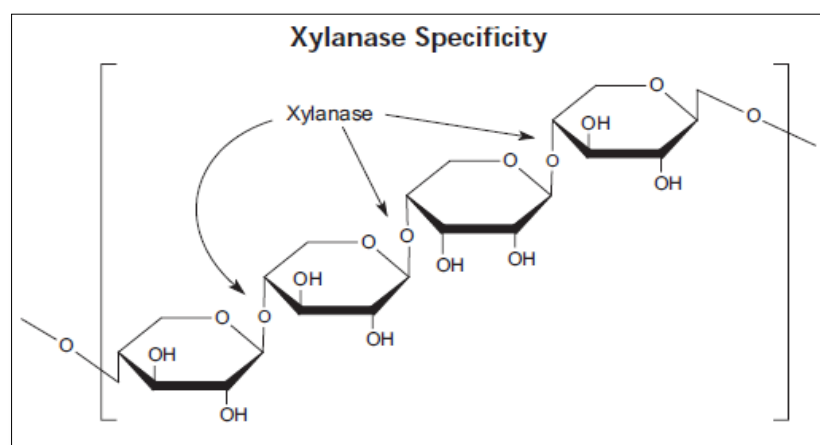


Figura 4. Especificidad de las xilanasas (enlaces β (1 \rightarrow 4))

Celulasas

El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa (Cx) (1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), la exo- β -1,4-glucanasa (C1) (1,4- β -Dglucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y la β -1,4-glucosidasa (celobiasa) (Cb) (β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21). El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo β -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura (**Figura 5**).

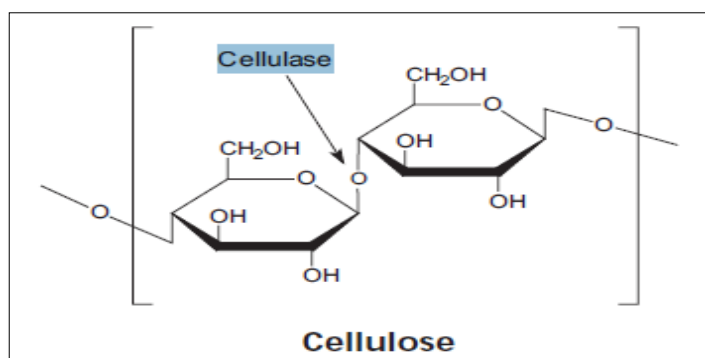


Figura 5. Especificidad de las celulasas (enlaces β -1,4 glucosídicos)

Glucanasas/ laminarinasa

Las glucanasas son enzimas que degradan β -glucanos y se clasifican en dos grandes grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato, identificados por los productos de hidrólisis: las exo- β -glucanasas, las cuales hidrolizan el sustrato por ruptura secuencial de residuos de glucosa desde el extremo no reductor, y las endo- β -glucanasas, que rompen aleatoriamente los sitios de enlace β de la cadena polisacáridica, liberando pequeños oligosacáridos (**Figura 6**).

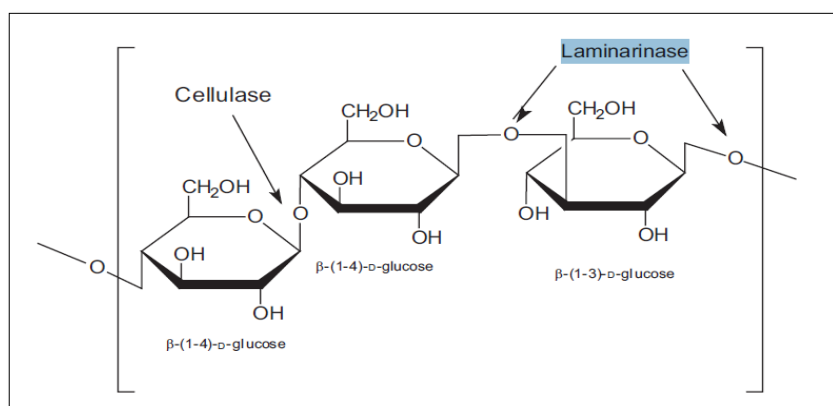


Figura 6. Especificidad de las glucanasas / laminarinasa (enlace β de la cadena polisacáridica)

β -Galactosidasa

Es una enzima que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos, rompiendo el enlace Oligo- β -1,4 Galactosa-Glucosa (**Figura 7**).

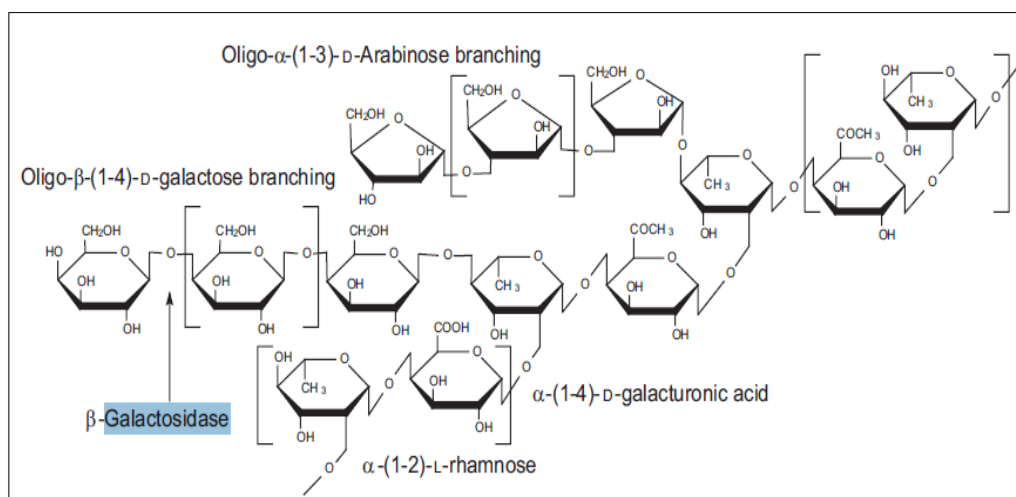


Figura 7. Especificidad de β -galactosidasa (enlace Oligo- β -1,4 Galactosa-Glucosa)

α –amilasa

La alfa-amilasa cataliza la hidrólisis de la cadena lineal (amilosa) y la ramificada (amilopectina) del almidón, rompiendo enlaces endo- α -1,4 (endo-amilasa) para formar una mezcla de dextrinas (**Figura 8**).

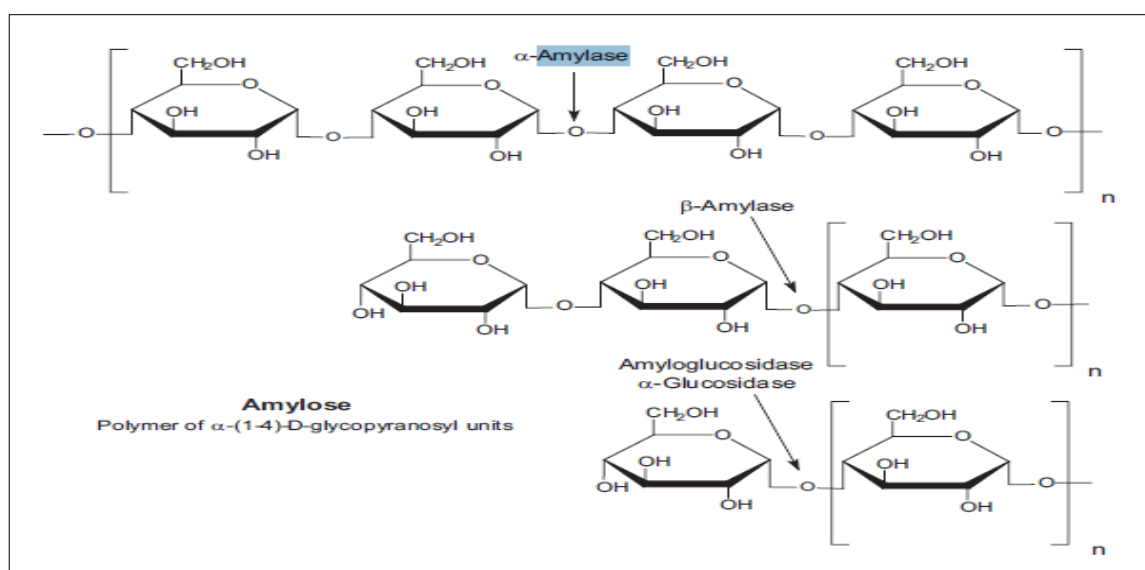


Figura 8. Especificidad de α –amilasa (enlaces endo- α -1,4 (endo-amilasa)

Métodos

Desengrasado de la harina

En primera instancia se realizaron dos ensayos con las tres especies de harinas desengrasándolas y no desengrasándolas, utilizando como solvente hexano al 98% según la

técnica de Englyst, con la finalidad de determinar si los lípidos de la propia harina interfieren con los métodos de cuantificación por espectrofotometría.

Para ello se pesaron 5 g de cada especie de las harinas, colocándolas en tubos falcón de 25 mL, se lavaron con solución de hexano al 98%, en una proporción hexano:harina de 3:1 en peso, agitando vigorosamente en un mezclador de alimentos durante 30 minutos, a 25°C. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 4000 *g* durante 10 min a 25°C, el sobrenadante se retiró con cuidado sin remover el sedimento, que posteriormente se seco en baño maría a 70 °C durante 1 h aproximadamente (Englyst *et al.*, 1994).

Cuantificación de la proteína

Para la cuantificación de la proteína soluble de cada muestra se utilizó el método de Bradford (1976). Es una técnica sensible (2.5 – 20 µg de proteína/mL) fundamentada en el cambio de color del Azul Brillante de Coomassie G-250. Su forma roja (protonada) se convierte en una forma azul (no protonada) después formar un complejo con las proteínas al interactuar con los residuos de arginina, histidina, lisina, tirosina, triptófano y fenilamina. El complejo presenta una absorbancia máxima a 595 nm, que es proporcional a la concentración de proteína contenida en la muestra.

La determinación del contenido de proteína soluble se realizó por microensayo en placa Microtiter, colocando 10 µl de muestra + 190 µl del reactivo de Bradford. A los 10 min se midió la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas. Para poder determinar el contenido proteico de una muestra se requiere la comparación del valor de absorbancia de la muestra con los obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas, con lo que se construye una recta de calibración. A pesar de la proporcionalidad del método, es sólo lineal hasta un cierto límite de concentración (800 µg de proteína/mL).

La recta patrón (**Figura 9**) fue preparada con una solución madre de 10 mg de albúmina bovina (BSA) en 10 mL de agua destilada (1mg/mL). De la solución madre se prepararon distintas concentraciones (0 hasta 500 µg/mL), una vez preparadas se pusieron por triplicado las muestras colocándolas en placa Microtiter, utilizando en cada pocillo 10 µl de muestra + 190 µl del reactivo de Bradford. El blanco fue 10 µl de agua destilada + 190 µl del reactivo. La concentración de proteína de la muestra se determinó por interpolación de su valor de absorbancia en la recta de calibrado. En caso necesario, la muestra se diluyó para que entrase en rango y la concentración de proteína determinada se multiplicó por el factor de dilución.

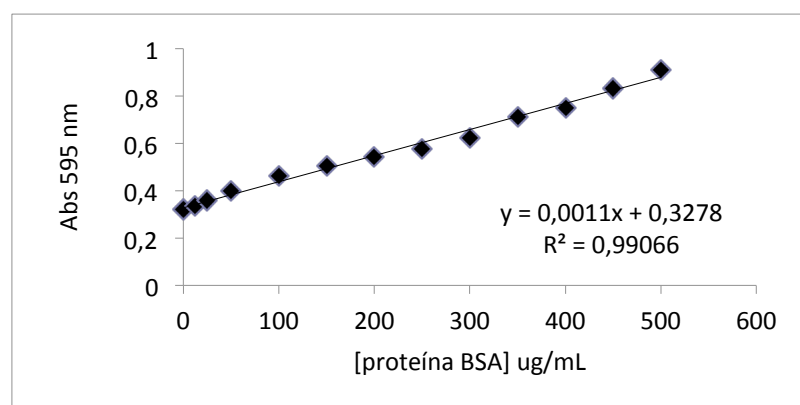


Figura 9. Recta patrón utilizada

Determinación de la actividad inhibidora de la tripsina

Esta determinación se realizó según la metodología descrita por Page *et al.* (2000) basada en comparar la actividad residual de la tripsina, tras una preincubación con el potencial inhibidor, con la actividad de la tripsina control, para determinar el % de inhibición de la tripsina. La actividad amidasa de la tripsina se midió usando BAPNA (Nα-Benzoil-DL-Arginina-p-nitroanilida) como sustrato, según la técnica de Erlanger *et al.* (1961). El sustrato se preparaba disolviendo 43,5 mg de DL-BAPNA en 1 mL de DMSO (dimetilsofóxido)(1mM) que se diluyó hasta 100 mL con buffer 50 mM de Tris-HCl, 20 mM CaCl₂, pH 8.2.

El procedimiento consistió en una preincubación de la tripsina con el extracto soluble de la harina, que contenía el posible inhibidor, durante 15 min a 25°C. A continuación se añadía el sustrato y se determinaba la actividad residual de la tripsina, como se ha descrito anteriormente. El proceso se ha estructurado y detallado en la **Tabla 5**.

La actividad inhibidora se expresa como % de inhibición y se calcula según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Inhib.} = \frac{(Abs \text{ activ} - Abs \text{ blanco}) - (Abs \text{ activ residual} - Abs \text{ blanco harina})}{(Abs \text{ activ} - Abs \text{ blanco})} \times 100$$

Tabla 5. Protocolo para el ensayo de inhibición en microplacas

Reactivos	Actividad tripsina		Inhibición	
	Blanco	Actividad	Blanco harina	Actividad residual
Extracto de harina	--	--	50 µL	50 µL
Medio de extracción	50 µL	50 µL	--	--
Buffer	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Enzima	--	25 µL	--	25 µL
Sustrato	125 µL	--	125 µL	--
Incubación 1	15 min a 25°C			
Sustrato	--	125 µL	--	125 µL
Incubación 2	10 min a 25°C			
Acido acético	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Enzima	25 µL	--	25 µL	--
Medición	Abs a 405 nm			
Medio de extracción de la harina: HCl ó NaOH 0.001 N, según el pH de extracción				
Buffer: Tris-HCl 100 mM pH 8.2				
Enzima: tripsina 1 mg/mL en HCl 0.001 N (dilución 1:15)				
Sustrato: 0.1 mM de BAPNA en Tris-HCl 50 mM, 20 mM CaCl ₂ , pH 8.2				
Ácido acético glacial al 30% V/V				
BLANCOS: sólo se realizó la incubación 2				

Diseño experimental

Determinación del índice de solubilización de la proteína de las harinas en función del pH

La metodología seguida se basó en la descrita por Walsh *et al.* (2003) realizando la determinación no del nitrógeno sino de la proteína soluble.

Obtención de la proteína soluble a diferentes pHs

Este proceso consistió en extraer la proteína de las harinas, sometiéndolas a distintos pHs (desde 2 hasta 11), utilizando ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, con la finalidad de solubilizar la proteína presente en las harinas.

Para ello se calculó el peso equivalente de cada harina en base a 1% de proteína bruta presente en masa seca (MS), las cuales se colocaron en vasos de precipitado de 25 mL con unos 20 mL de agua y se agitaron durante 2 hrs, ajustándoles el pH desde 2-11, utilizando HCl y NaOH 1N. Se realizaron 3 ensayos para cada especie de harina y pH. Transcurrido el tiempo se aforaron en 25 mL con agua y se tomaron alícuotas de 1 mL para centrifugar a 12000 g durante 15 min a 2°C. Del centrifugado obtenido se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C.

Determinación del índice de solubilización de la proteína (PSI, %)

Se determinó la proteína soluble de los sobrenadantes correspondientes a cada especie de harina y pH, utilizando el método de Bradford ya descrito, diluyendo en cada caso el extracto (factor de dilución, fd) para poder interpolar los datos de absorbancia en la recta de calibrado. Para la determinación de índice de solubilización de la proteína se utilizó la fórmula siguiente:

$$PSI, \% = \frac{[proteína\ soluble] \times fd}{[proteína\ bruta]} \times 100$$

Valoración de la inhibición de la actividad proteasa por las harinas

La metodología seguida se basó en la descrita originalmente por Kakade *et al.* (1974) y modificada por Smith *et al.* (1980), que fue adaptada a microplacas por Page *et al.* (2000).

Extracción del inhibidor

Para la extraer el ó los posibles inhibidores se realizaron extracciones en base a 1.5 % de proteína en masa seca (MS), de las tres harinas por triplicado. Las cantidades correspondientes de cada harina se colocaron en vasos de precipitado de 25 mL, agregando 20 mL de agua miliQ y ajustando el pH a 2.5 y 9.5, utilizando HCl y NaOH 1N, mezclándolos durante 1 h con agitador magnético. Transcurrido el tiempo se aforaron en 25 mL y se tomaron alícuotas de 1 mL para poder centrifugar a 18000 g durante 15 min a 2°C, para así poder después recuperar el sobrenadante eliminando la capa lipídica.

Valoración de la actividad inhibidora

Para realizar la valoración de la actividad inhibidora se utilizaron concentraciones crecientes de harina en el extracto que se preincubó con una cantidad constante de tripsina. La ratio harina:enzima fue: 0 – 1.5% proteína bruta en masa seca de harina : 0.067 mg/mL de tripsina. En cada caso se determinó el grado de inhibición (%) según se ha descrito.

Tratamiento de las harinas con carbohidrasas y extracción proteica

Tratamiento enzimático

Las harinas de las tres especies de altramuza se trataron con diferentes productos enzimáticos comerciales, que contenían una actividad enzimática declarada en cada caso, según se describe en el apartado de Material. Tras estudiar las hojas técnicas de cada producto se obtuvieron los datos de actividad, pH y T^a óptimos (**Tabla 4**). Con estos se determinó la T^a del ensayo (40°C) y el buffer-pH utilizados: acetato 0.1 M, pH 5 para todas, excepto la amilasa que fue incubada en buffer citrato 50 mM, pH 6.2.

El tratamiento se realizó poniendo ~ 0,5 g en MS de cada harina (equivalente al 1% de proteína bruta) en 15 mL de buffer precalentado en un vaso de precipitado, en un baño a 40°C y con una cantidad de enzima equivalente a 80 unidades de actividad, de acuerdo con la descripción técnica del fabricante. La mezcla se mantuvo en agitación continua durante 60 min. Para el control no se añadió enzima en esta fase.

Extracción de la proteína soluble a pHs 2.5 y 9.5

Terminado en tratamiento enzimático los vasos se enfriaron hasta 25°C y se ajustó el pH a 2.5 ó 9.5 con HCl y NaOH 6N en cada caso. La mezcla se mantuvo en agitación durante 60 min, a 25°C, manteniendo el pH constante durante el tiempo de extracción. En este punto, a los vasos correspondientes a los controles (sin carbohidrasas) se le añadió un volumen de solución de enzima, equivalente a 80 U, que previamente había sido mantenido 10 min a 100°C en baño María. Finalmente todos los vasos se aforaron a 25 mL con agua miliQ. La ratio E:S fue 80 U/enzima : 0.5 mg MS / harina en 25 mL de volumen final. Se tomaron alícuotas de 2 mL y se centrifugaron a 18000 g, 15 min a 2°C para obtener la fracción soluble libre de grasas. En cada caso se determinó la concentración en proteína soluble y la actividad inhibidora de la tripsina, como se ha descrito anteriormente.

Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron por duplicado. Cada muestra se analizó por triplicado. Los datos se expresan como valor medio \pm la desviación estándar de la media (SD). Antes del análisis estadístico se comprobó la normalidad y homogeneidad de la varianza utilizando los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene con $P \leq 0.05$, respectivamente. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y se establecieron diferencias significativas para $P < 0.05$ (Kirkpatrick y Feeney, 2012). Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corporation, NY, USA). Para la representación gráfica de los resultados se utilizó el programa Microsoft Excel (Microsoft Co., Seattle, WA).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos del diseño experimental planteado se estructuran en dos apartados: a) la solubilización de la proteína de las harinas de las 3 especies de altramuces estudiadas y el efecto inhibitor de la actividad de la tripsina presente en estas proteínas solubilizadas; y b) la influencia del tratamiento con carbohidrasas (xilanasas, glucanasas, galactoxidasa, celulasa y amilasa) en la solubilización de las proteínas y su inhibición de la actividad tripsina, comparadas con la misma harina no tratada.

Efecto del pH en la solubilización de la proteína de las harinas de altramuz

Los resultados de este experimento (**Figura 10**) nos muestran que el perfil de solubilización de las proteínas (expresado como PSI, %) en función del pH es muy similar para las 3 especies de altramuces estudiadas, presentando una mayor solubilización a pHs muy ácidos (2) y alcalinos (9). A pH ácido, la máxima solubilización se alcanza a pH 2, para las 3 especies, aunque la harina de *L. albus* presenta un 10% más de solubilización que las otras harinas. A pH alcalino, la máxima solubilización se alcanza a pH 8, siendo en este caso *L. mutabilis* la que presenta un 10% más de solubilización de proteína (75%) que *L. albus* y *L. angustifolius* (65%). A partir de pH 8, las 3 especies presentan un perfil de solubilización equivalente al máximo y constante, independiente del pH de extracción.

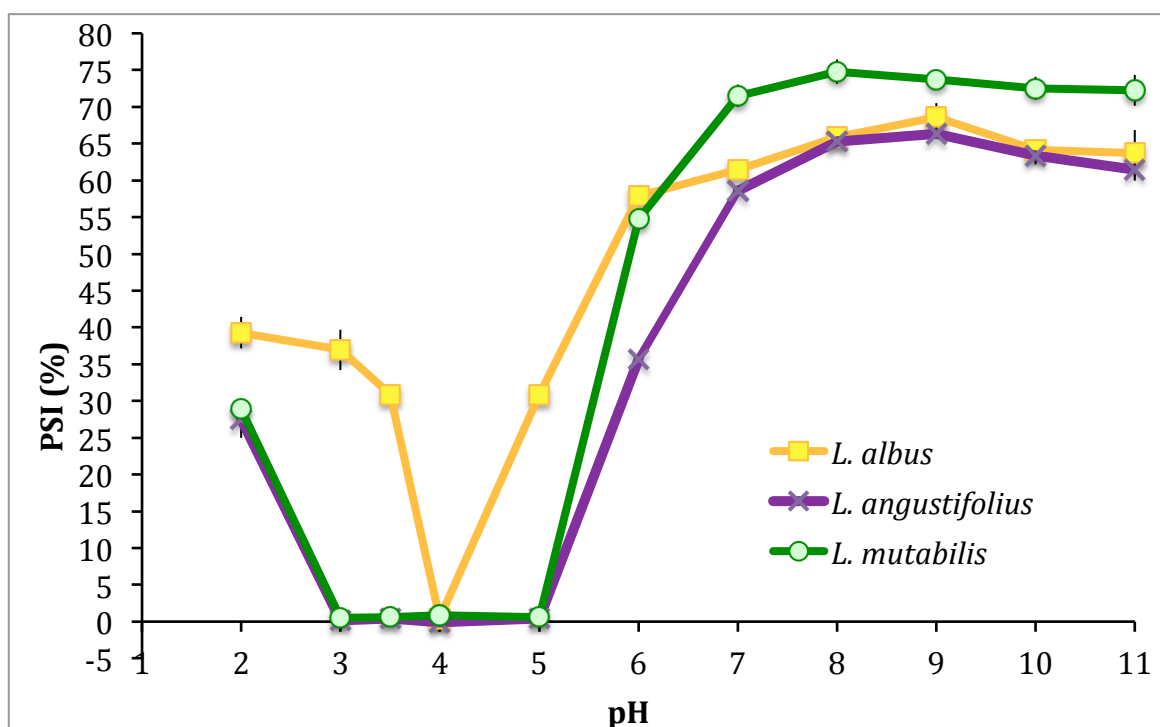


Figura 10. Cambios en los niveles de proteína soluble en las harinas de 3 especies de altramuz en función del pH de disolución. La proteína soluble se expresa como índice de solubilización de la proteína (PSI, %). La suspensión inicial contenía 10 mg de proteína bruta /mL

Valoración de la inhibición de la actividad proteasa (tripsina) por las harinas de altramuz

En este apartado se realizó una valoración de la concentración de inhibidores de tripsina que se había solubilizado en las extracciones de las tres harinas de altramuz, a pH ácido (2.5) y alcalino (9.5). Dicha valoración se realizó incrementando la ratio [harina extraída]:[tripsina] que osciló entre 0 – 1.5% de proteína bruta (aprox. 3% de masa seca) para una concentración de tripsina de 0.067 mg/mL (**Figura 11**).

La extracción de la proteínas a **pH ácido** originó un máximo de inhibición de la tripsina para *L. albus* y *L. mutabilis*, de 65 y 77%, mientras que la especie *L. angustifolius* inhibe la tripsina en un 42%. Se han encontrado diferencias en el perfil de inhibición de las harinas estudiadas: mientras que *L. mutabilis* se ajusta a un perfil de Michaelis-Menten en el que a partir de 1.5% de concentración de harina disminuye drásticamente la progresión del grado de inhibición, las otras dos harinas presentan un perfil lineal. Este dato indica que con las concentraciones de harina ensayadas para *L. albus* y *L. angustifolius* no se ha alcanzado el máximo de inhibición.

En el experimento a **pH alcalino** (9.5), *L. angustifolius* muestra un mayor porcentaje de inhibición del enzima (95%) que el resto de las especies, mientras que *L. albus* y *L. mutabilis*, presentan unos máximos de inhibición similares a los encontrados a pH ácido, en un rango de 68 y 78% respectivamente. El perfil de inhibición presenta en los 3 casos una tendencia a la saturación, no mostrando un aumento significativo de la inhibición a partir de una concentración de harina del 2.8%.

Cuando se comparan las dos extracciones del él o los posibles inhibidores de tripsina presentes en las harinas se encuentran unas inhibiciones similares en *L. albus* y *L. mutabilis*, mientras que el perfil de inhibición se comporta de forma muy diferente en *L. angustifolius*, tanto en su progresión como en las inhibiciones máximas encontradas. En este caso, el pH alcalino solubiliza una mayor cantidad de inhibidor que produce la inhibición casi total de la cantidad de tripsina ensayada.

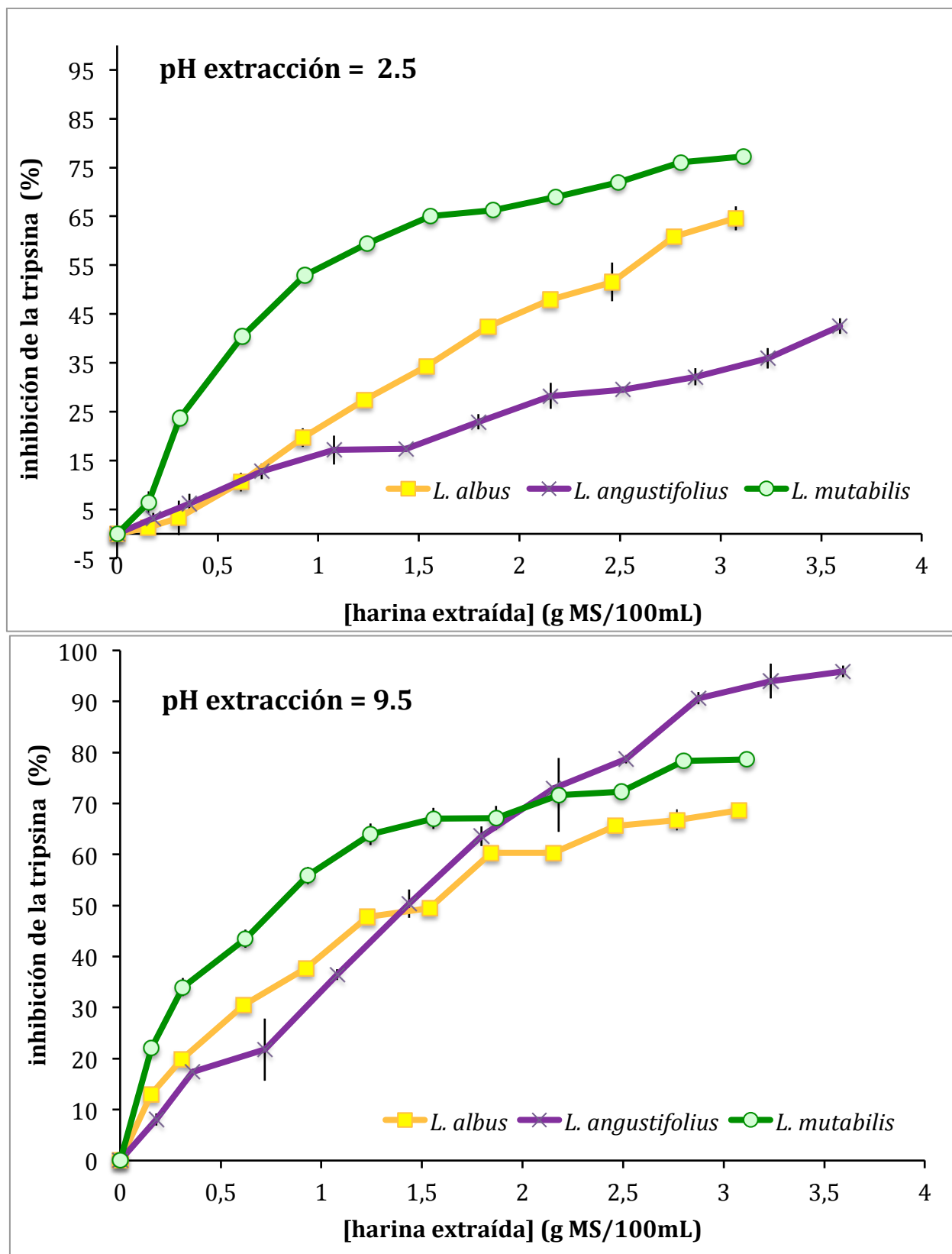


Figura 11. Valoración de la actividad inhibidora (% inhibición de la tripsina) de las harinas de altramuz, extraídas a pHs 2.5 y 9.5. La ratio harina:enzima se incrementó y [enzima]=cte.

Tratamiento de las harinas de altramuz con carbohidrasas

Efecto de la adición de carbohidrasas sobre la solubilización de la proteína

El experimento consistió en un pre-tratamiento de las harinas de altramuz con una serie de preparados enzimáticos de carbohidrasas, con actividad xilanasa, glucanasa, galactosidasas, celulasa y amilasa en las condiciones óptimas para la actividad del enzima, y una posterior solubilización y extracción de las proteínas solubles, a pHs ácidos y alcalinos, medidas por el método de Bradford en el sobrenadante.

Los resultados obtenidos en la extracción ácida (**Figura 12**) nos muestran:

a) Para *L. albus*, un aumento significativo de la liberación de proteínas cuando se trató con xilanasa (Xila1) de Novozyme, liberando un máximo de 31% más respecto al no tratado. En el caso con a la adición de glucanasa (Gluca), muestra una tendencia a liberar proteína con valores significativos elevados de un 79% más con respecto al no tratado, y para el tratamiento con celulasas (Celul) el porcentaje de solubilización fue de un 28% más, respecto al no tratado. En el caso de la glucanasa cabe destacar que la proteína soluble del control fue excepcionalmente baja.

b) Para la especie *L. angustifolius* se encontró un comportamiento de liberación de proteína significativo, para los tratados con xilanasa (Xila1), galactanasa (Galac) celulasa (Celul) y amilasa (Amila), que mejoró en más de un 25% respecto a los no tratados.

c) *L. mutabilis* sólo presentó una tendencia a liberar proteína cuando se somete con xilanasa (Xila1) y glucanasa (Gluca), a excepción del tratado con Amila en cual muestra un efecto negativo sobre la disponibilidad de la proteína.

Los resultados obtenidos en la extracción alcalina (**Figura 13**) nos muestran:

a) Para *L. albus* muestra liberación de proteína solo cuando se trata con amilasa (Amila), para el resto de los tratados, presentan valores similares con respecto a sus blancos, los cuales no representan cifras significativas de liberación proteica.

b) En el ensayo con *L. angustifolius*, los resultados no muestran ningún dato significativo de liberación de proteína en todos los casos tratados, pero se observa para el tratamiento con amilasa (Amila) que influye negativamente en la liberación.

c) Para *L. mutabilis*, presenta el mismo comportamiento de la especie *L. angustifolius*, al inhibir la liberación de la proteína con amilasa (Amila), a excepción del caso con xilanasa (Xila1) que muestra liberación en un 31% más que el no tratado.

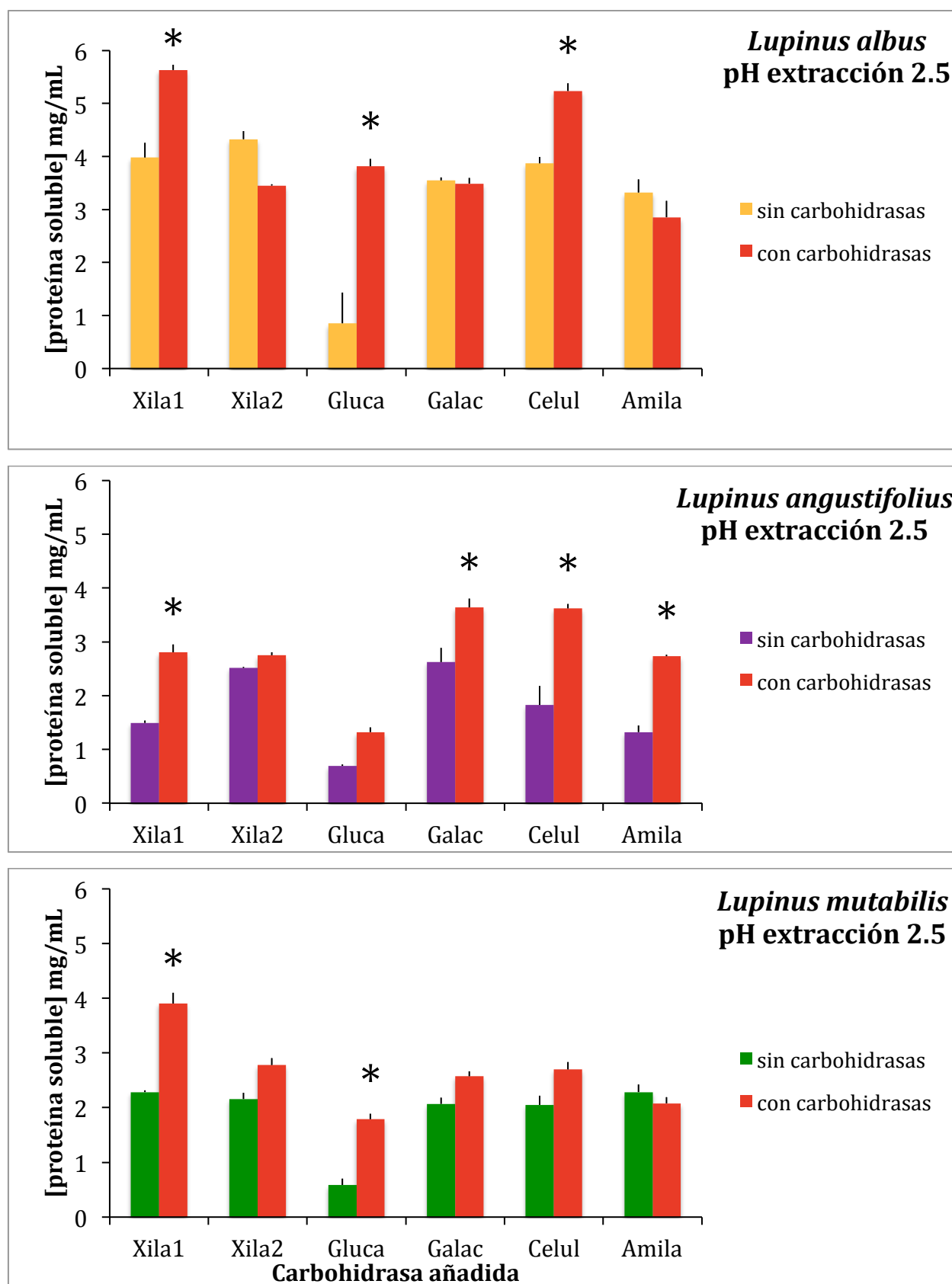


Figura 12. Efecto de la adición de carbohydrasas a las harinas de altramuza sobre la proteína soluble (mg/mL) extraída a pH 2.5. * indica diferencias significativas para $P < 0.05$. El significado de las abreviaturas de las enzimas viene indicado en el apartado de Material.

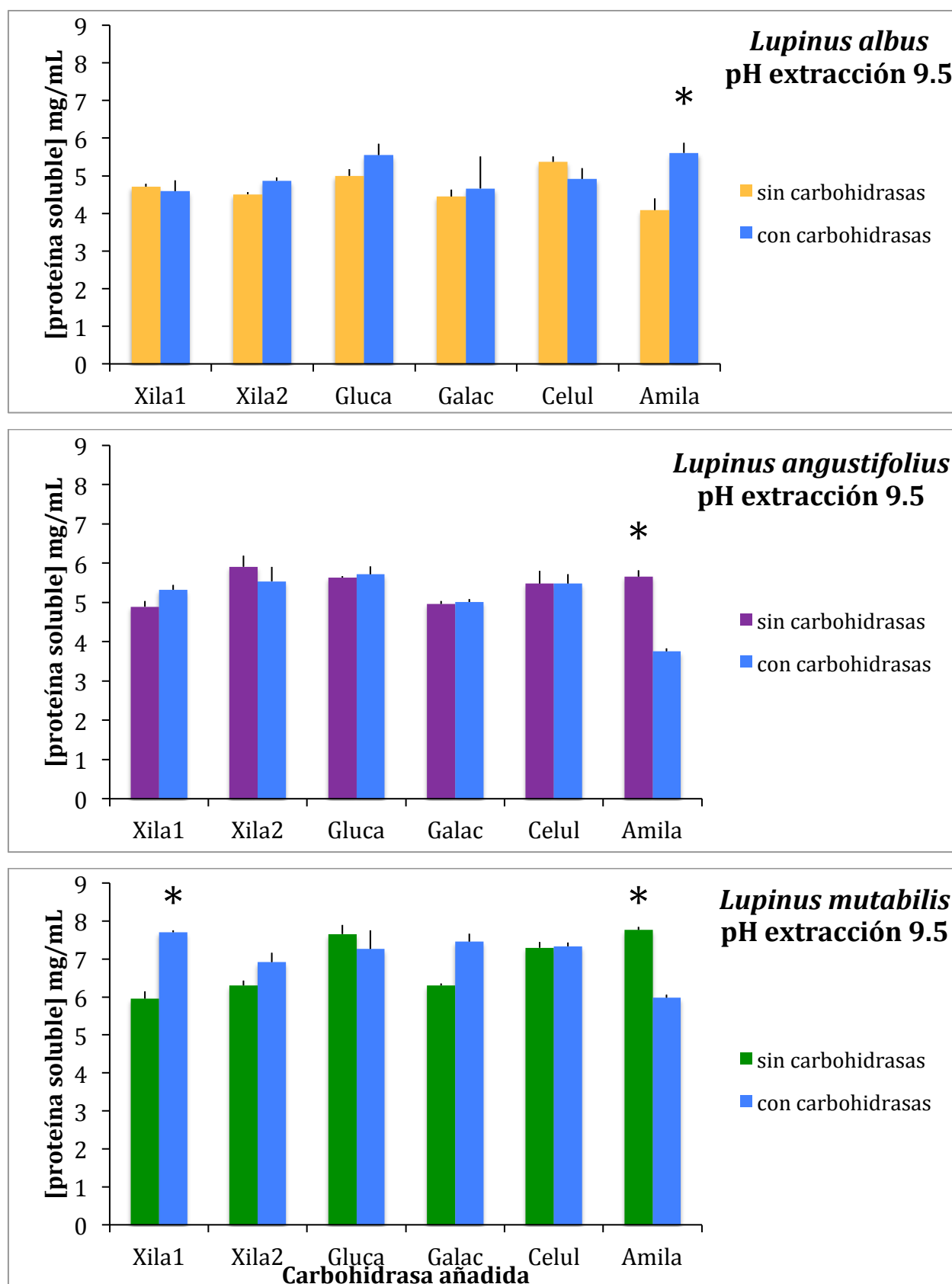


Figura 13. Efecto de la adición de carbohydrasas a las harinas de altramuç sobre la proteína soluble (mg/mL) extraída a pH 9.5. * indica diferencias significativas para $P < 0.05$. El significado de las abreviaturas de las enzimas viene indicado en el apartado de Material.

Efecto de la adición de carbohidrasas sobre la actividad inhibidora de la tripsina

De forma paralela a la cuantificación de las proteínas solubles extraídas tras los pre-tratamientos con carbohidrasas, se midió el grado de inhibición de la tripsina que presentaban las proteínas solubilizadas.

Los resultados en la extracción ácida (**Figura 14**) nos indican que *L. albus* y *L. mutabilis* tienen prácticamente comportamientos similares con y sin la adición de las enzimas. Inclusive en algunos tratamientos control, las propias harinas presentan mayor liberación de inhibidores de la tripsina que en aquellas previamente tratadas con carbohidrasas. Para el caso en particular de *L. angustifolius*, con la adición de celulasa (Celul), muestra un mayor porcentaje de inhibición de la tripsina, comparada con el resto de los tratamientos de las demás carbohidrasas (Xila1, Xila2, Gluca, Galac y Amila).

Los resultados en la extracción alcalina (**Figura 15**) nos indican:

a) Para el tratamiento de la especie *L. albus* con xilanasa (Xila1) y glucanasa (Gluca) muestran un incremento de un 75% y 72% respectivamente de inhibición de la tripsina, comparado con su blanco. El dato, a pesar de ser estadísticamente significativo, no debería tenerse en cuenta dado el anómalo bajo porcentaje de inhibición obtenido para los blancos. El resto de los tratamientos con las distintas enzimas para esta especie no muestran diferencias significativas entre harinas tratadas y no tratadas.

b) Para *L. angustifolius* cuando se trata con xilanasa (Xila1) se observa un 52% más de inhibición comparado con su blanco, el resto de los tratamientos con las diferentes carbohidrasas no muestran valores relevantes.

c) *L. mutabilis* muestra similitud de inhibición de la tripsina cuando se ensayan con o sin la adición de las distintas carbohidrasas, no muestran cifras significativas con respecto a sus blancos.

En general podríamos afirmar que los tratamientos con las carbohidrasas ensayadas no modifican la solubilización de los inhibidores de tripsina de las harinas de altramuza extraídos a pH 9.5, en todo caso, la tendencia es que el tratamiento disminuya la cantidad de inhibidor solubilizado a pH alcalino.

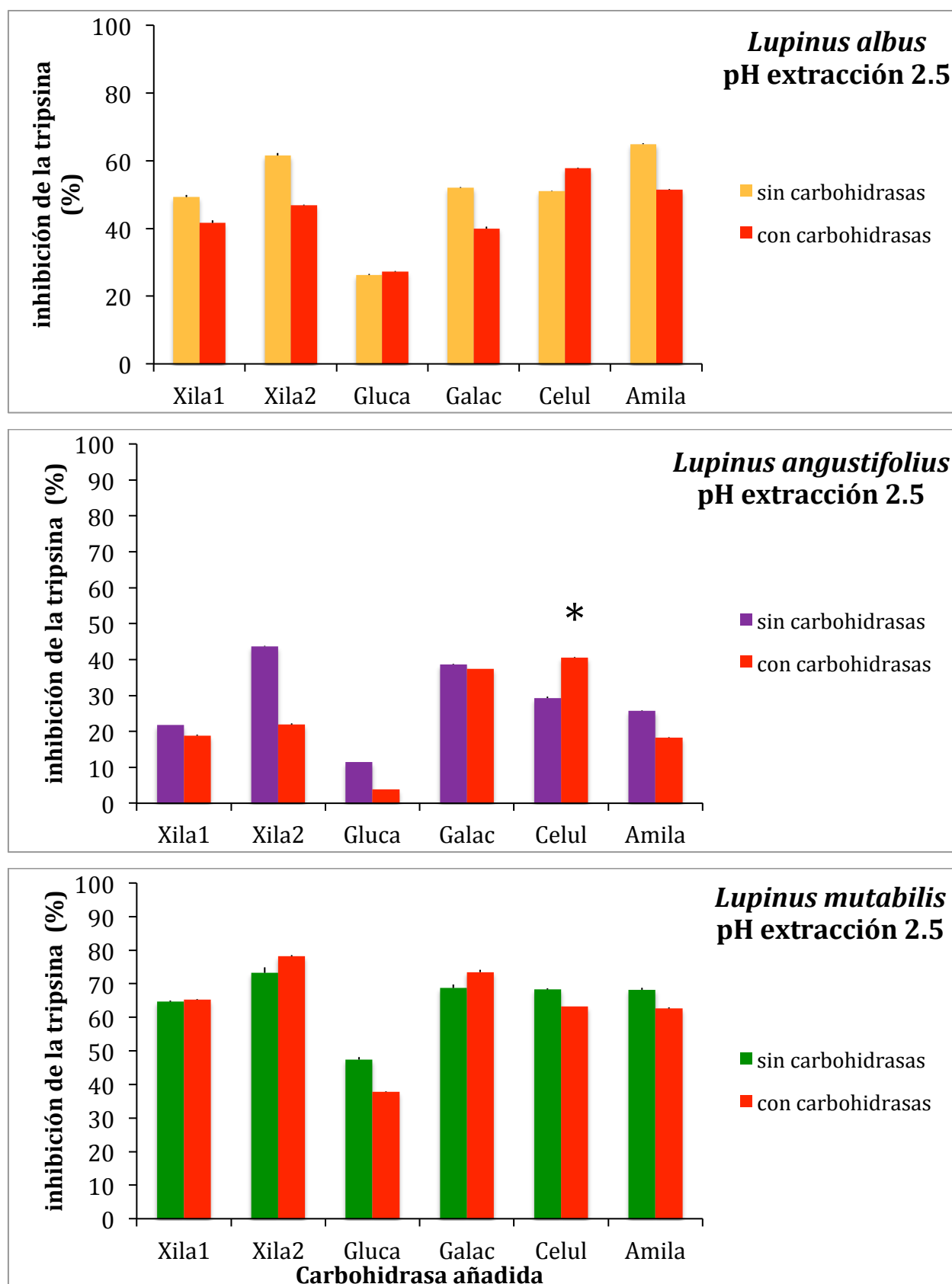


Figura 14. Efecto de la adición de carbohidrasas a las harinas de altramuç sobre la inhibición de la tripsina (%) por la fracción soluble extraída a pH 2.5. * indica diferencias significativas para $P < 0.05$. Abreviaturas de las enzimas: vienen indicadas en el apartado de Material.

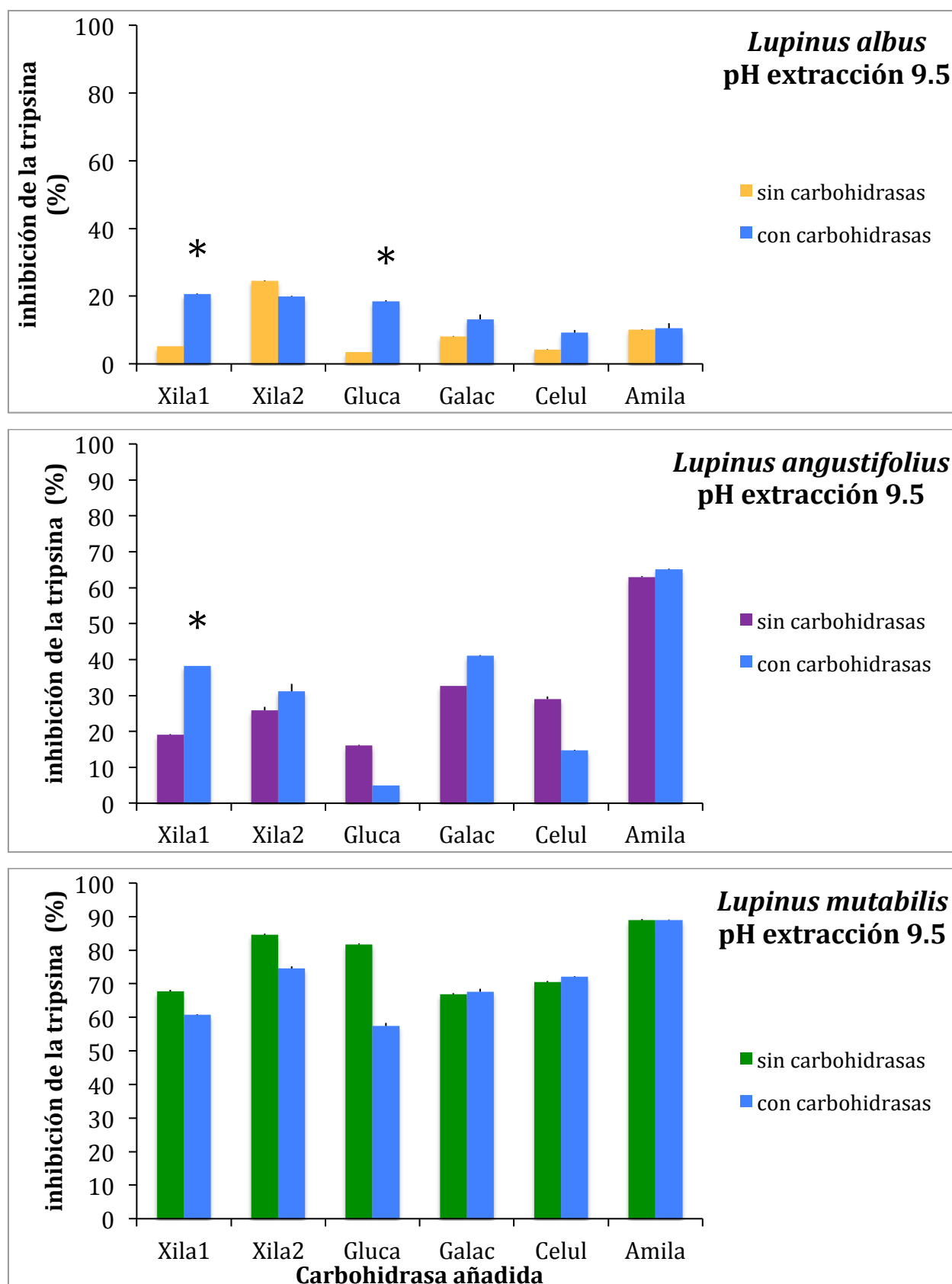


Figura 15. Efecto de la adición de carbohidrasas a las harinas de altramuç sobre la inhibición de la tripsina (%) por la fracción soluble extraída a pH 9.5. * indica diferencias significativas para $P < 0.05$. Abreviaturas de las enzimas: vienen indicadas en el apartado de Material.

DISCUSIÓN

El análisis de los resultados obtenidos de los distintos experimentos, nos permiten tratar de comprender la forma de cómo se comportan las harinas frente a la extracción ácida y alcalina de la fracción soluble de la proteína. Además, entender cómo se relaciona la cantidad de proteína extraída, con la liberación de inhibidores de las proteasas y cómo influye un pretratamiento con carbohidrasas en la solubilización de las proteínas y en la presencia de inhibidores de proteasas entre las mismas

De acuerdo a la literatura, la solubilidad de las proteínas a distintos pHs (ácidos y alcalinos), se encuentra influenciada por la capacidad de disociación (pKa) de los grupos ácidos y básicos de los residuos de los aminoácidos, que componen la cadena peptídica (Lehninger *et al.*, 2005)(**Tabla 6**). Estos valores, junto al aminograma de las harinas de altramuz estudiadas, justifican los índices de solubilización de la proteína (PSI) obtenidos: 65-75% PSI en el intervalo de pH 7-11 y una precipitación casi total de la proteína en el intervalo de pH 3-5. Esta pauta de solubilización es similar a la encontrada en otras semillas de leguminosas, como la soja (Obatolu & Cole, 2000) o el guisante (Rao *et al.*, 2010) aunque la solubilización en el intervalo de pH 3-5 suele ser de 5-10% ya que se mide como índice de solubilización de nitrógeno (NSI) y no como solubilización de la proteína. Esta precipitación de la proteína, mucho más marcada en *L. angustifolius* y *L. mutabilis*, que en *L. albus* (donde sólo aparece una precipitación total a pH 4) podría tener connotaciones negativas en la bioaccesibilidad de la proteína en el estómago de peces como la dorada (*Sparus aurata*), donde el pH del estómago suele ser próximo a 4.5 (Márquez *et al.*, 2012).

Tabla 6. Valores del pKa de los aminoácidos y de los residuos ionizables de las proteínas

pK _a Values	α-COOH	α-NH ₃ ⁺	R to R ⁻	R ⁺ to R
Gly	2.3	9.6		
Ala	2.3	9.7		
Leu	2.4	9.6		
Ser	2.2	9.2		
Thr	2.6	10.4		
Gln	2.2	9.1		
Asp	2.1	9.8	3.9	
Glu	2.2	9.7	4.3	
His	1.8	9.2		6.0
Cys	1.7	10.8	8.3	
Tyr	2.2	9.1	10.1	
Lys	2.2	9.0		10.5
Arg	2.2	9.0		12.5

La presencia de factores antinutricionales como los inhibidores de proteasas digestivas en harinas de leguminosas, además de ser frecuente, supone una pérdida del valor nutritivo de la materia prima debido a la influencia negativa que ejercen sobre la

biodisponibilidad de la proteína (Krogh *et al.*, 2010). Con objeto de estudiar la presencia de inhibidores de proteasas, tanto en materias primas como en piensos, se han publicado diversas técnicas que permiten la evaluación de estos inhibidores gracias a su naturaleza proteica, pudiendo ser solubilizados en medio acuoso junto a las demás proteínas y detectados/cuantificados por su reacción específica con la tripsina. Aunque el método oficial se basa en la extracción del inhibidor a pH alcalino (9.5)(Kakade *et al.*, 1974; Smith *et al.*, 1980) se han propuesto y aceptado otros métodos en los que la extracción se realiza a pH ácido (pH 2-3) que han permitido eliminar problemas técnicos derivados de la naturaleza de la materia prima (interferencias de color con la absorbancia del sustrato hidrolizado)(Valdebouze *et al.*, 1980).

Aunque las dos metodologías se han utilizado de manera indistinta en la literatura para determinar la actividad inhibidora de la tripsina (TIA) de ingredientes proteicos para piensos, los resultados obtenidos en el perfil de solubilización de la proteína en función del pH, para las 3 especies de altramuces estudiadas en este trabajo (**Figura 10**) con un índice de solubilización muy diferente para pH ácido y alcalino, se optó por cuantificar el grado de inhibición de la tripsina en los extractos obtenidos a pH 2.5 y 9.5.

Los resultados obtenidos muestran un contenido muy alto de inhibidores de la tripsina, tanto en las proteínas extraídas a pH ácido como alcalino, cuando se compara con otros resultados publicados: tasas de inhibición del 65 al 78% en *L. albus* y *L. mutabilis*, llegando al 95% en *L. angustifolius* (**Figura 11**) frente a la definición general de bajo contenido en inhibidores de tripsina de las harinas de altramuces (<20% de inhibición)(Jezierny *et al.*, 2010). La explicación de esta discrepancia podría estar en dos circunstancias:

a) La utilización de harinas crudas de altramuces en los ensayos, que han sido procesadas a baja temperatura durante su periodo de elaboración, evitando el calentamiento y evitando así una forma habitual de desnaturalizar los inhibidores del altramuces, que son termolábiles de tipo Browman-Birk (Saini, 1993).

b) En la extracción de las proteínas solubles de las harinas de altramuces eran extraídos a la misma vez colorantes propios de cada especie, que tenían diferentes intensidades de color amarillo (menor a pH ácido que alcalino). Este color amarillo puede interferir en la absorbancia a 405 nm de la p-nitroanilida que resulta de la hidrólisis del BAPNA por la tripsina. Para evitarlo se colocan blancos en el ensayo (**Tabla 5**) que eliminan la interferencia, aunque puede ser que no se eliminase del todo, principalmente cuando la extracción se hacía a pH 9.5. Esta circunstancia ya fue apuntada por Valdebouze *et al.* (1980) para el caso de las harinas de haba que daban reacción coloreada con el BAPNA interfiriendo en la medida de absorbancia. En ensayos futuros se deberá plantear un protocolo de medición de la actividad tripsina que no utilice el BAPNA como sustrato, que podría ser la azocaseína.

La utilización de enzimas exógenas en la producción de alimentos animales o en el tratamiento de sus ingredientes es una herramienta biotecnológica de gran utilidad, para coadyuvar en la mejora nutricional de los ingredientes proteicos de origen vegetal. Entre

estos efecto está: a) el incremento de la biodisponibilidad de aminoácidos libres, reduciendo el requerimiento de proteína de calidad como suplemento; b) la utilización de nuevos bioproductos como las harinas de linaza provenientes de la extracción de aceite; c) posibilidad de reducir problemas fisiológicos importantes al prevenir la diarreas en cerdos y aves de corral (Thorpe & Beal, 2001).

Los polisacáridos no amiláceos (NSP) representan una gran diversidad de componentes que poseen diferentes propiedades fisicoquímicas. Las principales se derivan de la naturaleza viscosa de estos polisacáridos, que tiene efectos sobre la morfología y fisiología del tracto digestivo e interaccionan con la microflora del intestino. Los NSP son muy comunes en los cereales pero también en ingredientes proteicos como las semillas de altramuza, en las que se encuentran en una gran proporción, representando 2 a 3 veces más concentración que en otras semillas de leguminosas.

Otra faceta de los NSP insolubles es que actúan como una **barrera física de las enzimas digestivas** (amilasas y proteasas principalmente) reduciendo su eficiencia en la digestión y ejerciendo un “efecto jaula” sobre el contenido de las células vegetales. Hay evidencias de que las enzimas con afinidad por los NSP insolubles (xilanasas) pueden también producir una respuesta positiva en el rendimiento productivo (crecimiento) de los pollos de engorde alimentados con piensos ricos en NSP. Esto es debido a que la ruptura de la matriz de la pared celular, especialmente sus componentes insolubles (celulosa y xiloglicanos) puede facilitar el acceso más sencillo de las enzimas digestivas a sus sustratos, dentro del corto periodo de tránsito intestinal que tienen estas aves (Choct, 2001).

Los resultados del experimento diseñado para estudiar *in vitro* este efecto en harinas de altramuza mostraron que el tratamiento con xilanasas y celulasa llevaba asociado un aumento significativo de la proteína soluble respecto al control, cuando las condiciones de extracción fueron a pH 2.5. Este efecto fue menos evidente en las proteínas extraídas a pH 9.5. Esto puede ser debido a que el pH óptimo de la xilanasas y celulasa ensayadas era de 5. Por el contrario, los tratamientos con carbohidrasas produjeron ningún incremento de la liberación de inhibidores de la tripsina.

Nuestros resultados van en la misma dirección que los obtenidos en ensayos *in vivo* con pollos de engorde alimentados con semillas de altramuza (*L. albus*) adicionadas de hemicelulasas y β -galactosidasas de pH óptimo 4-5. En este ensayo la adición de estas enzimas mejoró la digestibilidad aparente de la proteína y la retención de la materia seca (Brenes *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

1) El perfil de solubilización de las proteínas de las 3 especies de altramuza, en función del pH, presenta un intervalo de pH (3-5) en el que prácticamente todas las proteínas están precipitadas, salvo en *Lupinus albus*, que sólo precipitan a pH 4. Esto parece estar relacionado con el incremento en la solubilización de la proteína por acción de carbohidrasas a pH ácido.

2) La concentración de inhibidor de la tripsina solubilizado en paralelo a la proteína es muy elevada, produciendo tasas de inhibición del 65% al 78%, llegando al 95% en *Lupinus angustifolius*. Estas elevadas tasas de inhibición pueden estar relacionadas con el tratamiento de la harina y la naturaleza de los pigmentos amarillos que se liberan en la solubilización, por su interferencia en la medida de la inhibición.

3) En general, el pretratamiento con xilanasa y celulasa produce un incremento significativo en la liberación de proteínas solubles a pH 2.5, en las 3 especies de altramuza. Esto se debe a la ruptura de los componentes de la pared celular (celulosa y xiloglicanos) lo que permite una liberación de las proteínas. Este aumento no lleva asociado el incremento de la concentración de inhibidores de la tripsina.

BIBLIOGRAFÍA

- Birk, Y. and Peri, I. (1980). Saponins. In: *Toxic Constituents of Plant Food-stuffs*, pp: 1: 161-182. Liener, I.E. (Ed.), 2nd Edn., New York: Academic Press.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Brenes, A., Marquardt, R. R., Guenter, W., Viveros, A. (2002). Effect of enzyme addition on the performance and gastrointestinal tract size of chicks fed lupin seed and their fractions. *Poultry Science*, **81**: 670-678.
- Chesson, A. (1987). Supplementary enzymes to improve the utilization of pig and poultry diets. In *Recent Advances in Animal Nutrition*, pp: 71-89. Haresign, W., Cole, D. J. A. (Eds.). Butterworths, UK.
- Choct, M. (2001). Enzyme supplementation of poultry diets based on viscous cereals. In *Enzymes in Farm Animal Nutrition*: 145-159. Bedford, M. R., Partridge, G. G. (Eds.). Oxon, UK: CABI Publishing.
- De Haro, A. (1983). La calidad nutritiva de las leguminosas-grano y su control genético. En: *Leguminosas de grano*, pp: 211-249. Cubero, J.I., Moreno M.T. (eds.). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Domoney, C. (1999). Inhibitors of legume seeds. In *Seed proteins*, pp. 635-655. P. R. Shewry, & R. Casey (Eds.), Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.
- Englyst, H. N., Quigley, M. E., Hudson, G. J. (1994). Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *The Analyst*, **119**: 1497-1509.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **95**: 271-278.
- Gross, R. (1982). El cultivo y la utilización del Tarwi. Estudio FAO. Producción y protección vegetal, no. **36**, p. 36-48.
- Jeziorny, D. (2009). *In vivo* and *in vitro* studies with growing pigs on standardised ileal amino acid digestibilities in grain legumes. Ph.D. Thesis. University of Hohenheim, Stuttgart, Cuvillier Verlag Göttingen, Germany.
- Jeziorny, D., Mosenthin, R., Bauer, E. (2010). The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*, **157**: 111-128.
- Kakade, M. L., Rackis, J. J., McGhee, J. E., Puski, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, **51**: 376-381.
- Kirkpatrick, L. A., Feeney, B. C. (2012). *A simple guide to IBM SPSS Statistics for Versions 18.0 & 19.0*. Belmont, California: Wadsworth/Cengage Learning.
- Krogdahl, A., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, **41**: 333-344.
- Lampart-Szczapa, E. (2001). Legume and oilseed proteins. In *Chemical and functional properties of food proteins*, pp. 407-436. Sikorski, Z. (Ed.) Boca Raton, Florida, USA: CRC press.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005). *Lehninger. Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Liener, I.E. 1989. Antinutritional factors in legume seeds: state of the art. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Proceedings of the First International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds', Wageningen, The Netherlands November 23-25, 1988.

- Márquez, L., Robles, R., Morales, G. A., Moyano, F. J. (2012). Gut pH as a limiting factor for digestive proteolysis in cultured juveniles of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **38**: 859-869.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Vidal-Valverde, C. (2008). Alpha-Galactosides: Antinutritional Factors or Functional Ingredients? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48**: 301-316.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Vidal-Valverde, C. (2006). Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L.) after extraction of α -galactosides. *Food Chemistry*, **98**: 291-299.
- Obatolu, V. A., Cole, A. H. (2000). Functional property of complementary blends of soybean and cowpea with malted or unmalted maize. *Food Chemistry*, **70**: 147-153.
- Page, D., Quillien, L., Duc, G. (2000). Trypsin inhibitory activity measurement: Simplifications of the standard procedure used for pea seed. *Crop Science*, **40**: 1482-1485.
- Petterson, D. S. (2000). The Use of Lupins in Feeding Systems - Review -. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **13**: 861-882.
- Rao, G. N. B., Shrivastava, S. K. (2010). Effect of pH variation on solubility of seed protein of *Pisum sativum*. *Asian Journal of Chemistry*, **22**: 2027-2030.
- Reddy, N. R. and Salunkhe, D. K. (1980). Changes in oligosaccharides during germination and cooking of black gram and fermentation of black gram/rice blends. *Cereal Chemistry*, **57**: 356-360.
- Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Communities* L 147/1-L 147/40.
- Ruiz-López, M.A., García López, Castañeda, Vázquez H., Zamora, Garzón, de la Mora P., Bañuelos Pineda J., Burbano C., Pedrosa M., Cuadrado, C., Muzquiz, M. (2000). Chemical composition and antinutrient content of three *Lupinus* species from Jalisco, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, **13**: 193-199.
- Saini, H.S., 1993. Distribution of tannins, vicine and convicine activity in legume seeds. In: Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds, pp. 95-100. Van der Poel, A.F.B., Huisman, J., Saini, H.S. (Eds.), Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen.
- Smith, C., van Megen, W., Twaalfhoven, L., Hitchcock, C. (1980). The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **31**: 341-350.
- Tabachnikov, O., Shoham, Y. (2013). Functional characterization of the galactan utilization system of *Geobacillus stearothermophilus*. *The FEBS journal*, **280**: 950-964.
- Thorpe, J., Beal, J. D. (2001). Vegetable protein meals and the effects on enzymes. In *Enzymes in Farm Animal Nutrition*: 125-143. Bedford, M. R., Partridge, G. G. (Eds.). Oxon, UK: CABI Publishing.
- Valdebouze, P., Bergeron, E., Gaborit, T., T., Delort-Laval, J. (1980). Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds. *Canadian Journal of Plant Science*, **60**: 695-701.
- van Barneveld, R. J. (1999). Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutrition Research Reviews*, **12**: 203-230.
- Walsh, D. J., Cleary, D., McCarthy, E., Murphy, S., FitzGerald, R. J. (2003). Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Research International*, **36**: 677-683.